

機関番号：16301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2010

課題番号：21688018

研究課題名（和文） 葉内コンダクタンス測定のための減圧パルスークロロフィル蛍光計測法の開発

研究課題名（英文） Assessment of Photosynthetic Function by Analyzing Dynamic Change in Chlorophyll Fluorescence Intensity Induced by a Pulsed Pressure Reduction

研究代表者

高山 弘太郎（TAKAYAMA KOUTARO）

愛媛大学・農学部・講師

研究者番号：40380266

研究成果の概要（和文）：

本研究では、明期条件下において光合成を行っている葉の周辺空気を瞬間的に減圧（減圧処理）し、これに対するクロロフィル蛍光強度の応答を解析することで光合成機能の定量評価を試みた。具体的には、内容積 100 ml の透明アクリル製チャンバに葉を圧着固定し、青色 LED 光源からの光照射により励起されたクロロフィル蛍光を CCD カメラで撮像 (13fps) した。光合成速度、蒸散速度、チャンバ内気圧も同時に記録した。減圧パルス (0.3 秒以内に 101.3 kPa から 50.7 kPa に減圧、その後 10 秒間 49kPa 以下を維持) は、三方向電磁弁によりチャンバ内を密閉した直後に逆止弁付きの気体採取器を用いてチャンバ内空気を手動で引き抜くことでこれを行った。クロロフィル蛍光強度は、減圧パルス開始とほぼ同時に上昇し、約 3 秒後に最大となり、その後次第に低下した。なお、減圧処理後のクロロフィル蛍光強度の上昇幅を "Peak height" と定義した。この間、熱放散経路は活性化されておらず、また、減圧パルス前後で光合成速度と蒸散速度に変化は認められなかった。明期条件下にて二酸化炭素濃度を変化させながら、減圧パルスークロロフィル蛍光計測を行った結果、光合成速度と Peak height の間に強い相関があることが分かった。この結果は、減圧パルスークロロフィル蛍光計測法により光合成速度を簡便に測定できる可能性を示唆していた。なお、当初、本計測法により内部コンダクタンス計測を試みたが、減圧処理への蛍光強度の応答速度が 0.05 秒以下であったため、内部コンダクタンスの測定は困難であると結論付けた。

研究成果の概要（英文）：

We tried to develop a chlorophyll fluorescence imaging system to measure the mesophyll conductance without touching the plant body. Initially, we provided that the mesophyll conductance can be expressed with a relative index that is defined as the reciprocal of the response time of chlorophyll fluorescence emission to a rapid reduction of air pressure around the photosynthesizing leaf. A mature tomato leaf attached to the plant was fixed in the transparent acrylic leaf chamber with the inner size of 100 ml and acclimated to light (provided by blue LED) condition for stable photosynthesis. The chamber was hermetically closed and the air inside the chamber was immediately sucked by a manually powered pump. The air pressure inside the chamber decreased from 101.3 kPa to 50.7 kPa within 3 seconds and kept the air pressure less than 49 kPa for 10 seconds. During this procedure, the chlorophyll fluorescence intensity emitted by the leaf was continuously measured with the chlorophyll fluorescence imaging system at a frame rate of 13 fps. The response of chlorophyll fluorescence emission with the prompt reduction of air pressure was quite rapid and the chlorophyll fluorescence intensity increased within 0.05 second after the reduction of air pressure. Hence, we concluded that it is impossible to quantify the mesophyll conductance with this measurement systems and hypothesis. On the other hand, we found that the developed chlorophyll fluorescence imaging system and measuring method can be used to measure the photosynthetic rate. The chlorophyll fluorescence intensity increased just after the reduction of air pressure and reached to a peak at about 3 seconds after the reduction of air pressure. The height

of the peak showed a strong correlation with the photosynthetic rate measured under different CO₂ concentrations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
年度			
総計	17,100,000	5,130,000	22,230,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業情報工学

キーワード：農業工学, 植物応答, 生体情報計測, 植物診断

1. 研究開始当初の背景

植物の環境応答の解析には、植物生体情報を非破壊かつ非接触で連続的に計測できる技術が不可欠である。植物の環境応答を正確に把握することにより、植物生理生態学的に新しい知見を得られるばかりでなく、農業生産現場、特に生育環境をコントロールできる施設生産における環境制御戦略指針の提示も可能となる。

様々な植物生体情報のなかでも、植物の生命維持の根本である光合成機能に関する生体情報のプライオリティは高い。光合成の基質である CO₂ は、大気中から気孔を通して葉内に取り込まれた後、葉緑体のストロマに輸送され、カルビン・ベンソン回路の働きにより固定される。本研究では、葉内における CO₂ 輸送において重要な役割を果たしている葉内コンダクタンス (=1/葉内抵抗) ※1 に注目した。

※1：葉内コンダクタンスの定義と特異性

光合成において、大気中の CO₂ (Ca) は、葉を取り囲む境界層を通過し(Cs), 気孔を通過して気孔腔 (Ci) に移動し、さらに、葉内の気相および液相を通過して葉緑体のストロマでの CO₂ 固定反応が行われているサイト (Cc) に移動する(Fig.1)。葉内の CO₂ 拡散を律速するものが、葉内コンダクタンス(gm =1/葉内抵抗)である。葉内コンダクタンスの大きな特徴は、大気から気孔腔までの CO₂ 拡散が物理現象のみにより説明されるのに対し、唯一、酵素反応や代謝などの生物学的な制御が行われるという点である。

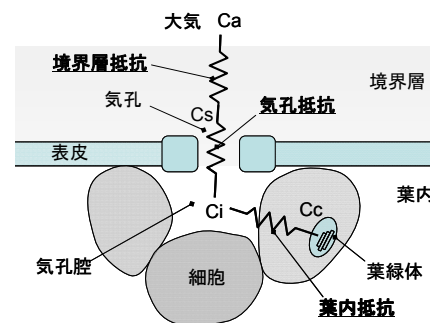


Fig.1 光合成における CO₂ 移動

なお、最近の研究(Warren 2006, Flexaset al. 2008)で、葉内コンダクタンスは気孔コンダクタンスと同程度に小さく(葉内抵抗は気孔抵抗と同程度まで大きい)、光合成の律速要因となることが分かってきており、葉内コンダクタンスを簡便かつリアルタイムに計測することは、光合成機能の詳細なモニタリングが可能になるだけでなく、施設生産等における栽培環境制御に対しても重要な知見を与える。

2. 研究の目的

光合成の基質である CO₂ は、大気中から気孔を通過して葉内に取り込まれた後、葉緑体のストロマに輸送され、カルビン・ベンソン回路の働きにより固定される。本研究では、葉内における CO₂ 輸送において重要な役割を果たしている葉内コンダクタンス (=1/葉内抵抗) を簡便かつリアルタイムに計測するた

めの「減圧パルス-クロロフィル蛍光計測法」を開発することを当初の目的とした。

3. 研究の方法

急激な減圧が可能なチャンバに生葉を固定し、明期条件下において光合成が定常状態となるようにする。次に、チャンバ内を瞬間的に減圧（減圧処理）し、一定時間（数秒程度）減圧条件を維持した後、大気圧に戻す（減圧パルス）。この減圧パルス間のクロロフィル蛍光強度の経時変化をモニタリングする。研究開始当初は、減圧パルス開始時点からChl 蛍光に減圧パルスの影響が出るまでにかかった時間（タイムラグ=Ti）を測定し、この逆数（=1/Ti）を葉内コンダクタンスの指標として使用できると想定していた。

4. 研究成果

(1) 減圧パルス-クロロフィル蛍光計測のためのシステム開発

システム構成: Fig. 2 に減圧パルス-Chl 蛍光画像計測システムの模式図, Fig. 3 に装置全体の写真を示す。内容積 100 ml の透明アクリル製チャンバに葉を固定し、チャンバ内空気を減圧した際の外気の流入を防ぐために、固定ネジを締め付けてチャンバ上下のOリングを圧着させた。

青色 LED 光源(CF Imager, Technologica)から均一な光を葉面に照射し、これによって励起された Chl 蛍光をロングパスフィルタ(CF Imager, Technologica)を装着した CCD カメラ(Stingray F145B ASG, Allied Vision Technologies GmbH)で撮像した。撮像された Chl 蛍光画像は、IEEE1394b インターフェースを介してコンピュータに取り込み、BMP 形式で記録した。なお、画像計測の時間分解能は 13 fps とした。

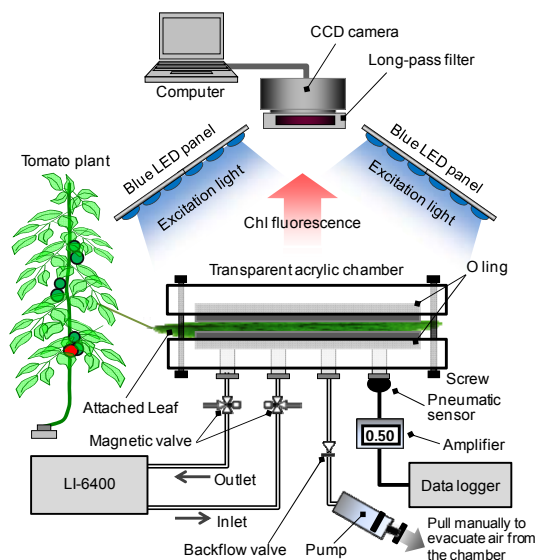


Fig.2 Schematic diagram of chlorophyll fluorescence imaging system with pulsed pressure reduction instruments

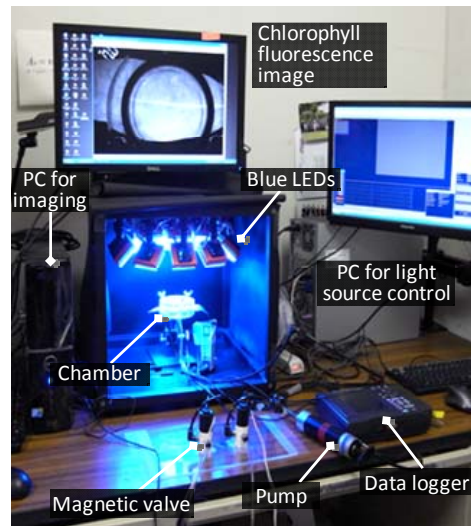


Fig.3 Photo of the chlorophyll fluorescence imaging system

画像データ取得後、Visual Basic 6.0 で作成した画像解析プログラムを用いて画像解析を行い、Chl 蛍光強度の経時変化を出力した。携帯型光合成蒸散測定装置 (LI-6400XTF, LI-COR Inc.) を用いて、チャンバに供給する空気の流量、CO₂ 濃度および H₂O 濃度を制御し、また、チャンバから流出する空気の CO₂ 濃度と H₂O 濃度を測定することで、測定対象葉の単位葉面積あたりの光合成速度と蒸散速度を算出した。なお、葉面積は Chl 蛍光画像を用いて算出した。チャンバ内の気圧測定には圧力センサヘッド (AP-44, (株)キーエンス) を用い、アンプ (AP-C40, (株)キーエンス) を介してデータロガー (8421-50, 日置電機 (株)) で記録した。

減圧パルス付与方法: チャンバ内空気の瞬間的な減圧は、三方向電磁弁 (テフロン三方メス型電磁弁, フロン工業 (株)) を用いてチャンバ内空気を密閉した直後に、逆止弁付きの気体採取器 (Model 801, (株)ガステック) を用いてチャンバ内空気を手動で引き抜くことでこれを行った。その後、減圧状態を 10 秒間維持したのちに三方向電磁弁を解放して大気圧に戻した。

(2) 減圧パルス-クロロフィル蛍光計測法で得られる光合成機能情報

トマト (*Solanum lycopersicum* L., 品種 Tricia, 定植: 2010/8/14) の完全展開葉 (attached) をチャンバに固定し、葉面における光強度を PFD 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 供給する空気 (流量は 300 $\mu\text{mol s}^{-1}$) の CO₂ 濃度を 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ とした。光合成速度および蒸散速度が安定したのを確認したのち、減圧パルスを与えた。Fig. 4 に減圧パルス前後の Chl 蛍光強度およびチャンバ内気圧の変化を示す。

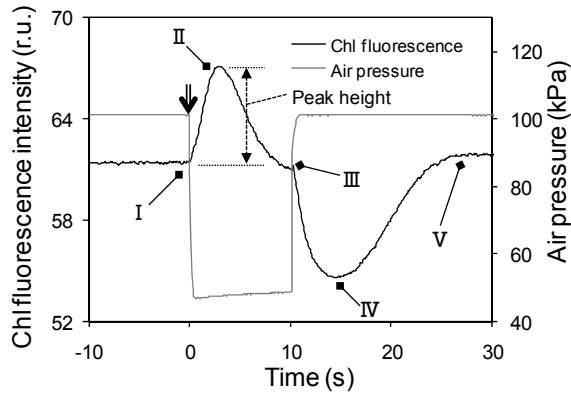


Fig.4 Changes in chlorophyll fluorescence intensity induced by a pulsed (10 seconds) pressure reduction. The downward double line arrow indicates the starting of the pulsed pressure reduction. I-V represent characteristic time points.

減圧操作(減圧パルス開始)により、チャンバ内空気圧は 0.3 秒以内に 101.3 kPa から 50 kPa に低下し、その後 10 秒間にわたって減圧状態を維持した。また、減圧パルス終了時の大気圧への復帰は 0.1 秒以内に完了した。この間の Chl 蛍光強度は、減圧パルス開始とほぼ同時に上昇し(I→II)、約 3 秒後に最大(II)となり、その後次第に低下(II→III)した。なお、I→IIのChl 蛍光強度の上昇幅を“Peak height”と定義した。減圧パルス終了時には、急激な Chl 蛍光強度の低下(III→IV)が確認され、減圧パルス終了から約 5 秒後に最小値(IV)となり、その後次第に上昇(IV→V)し、減圧パルス開始前と同程度の値(V)となった。

Fig. 5 に減圧パルスにより誘導される Chl 蛍光強度変化の特徴的な時点の Chl 蛍光強度画像を示す。本測定で用いたトマト葉については、葉面における不均一な Chl 蛍光強度変化は確認されなかった。また、減圧パルス前後で、光合成速度と蒸散速度に変化は認められなかった。

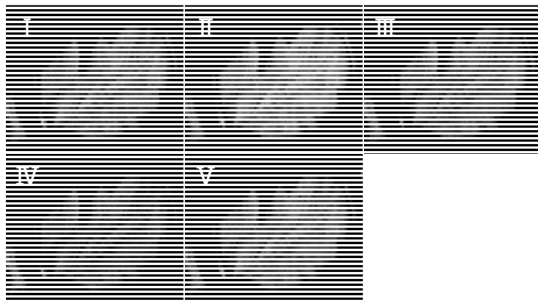


Fig.5 Chlorophyll fluorescence intensity images during a pulsed pressure reduction. I-V correspond to the time points indicated in Fig.4

次に、I→IIの Chl 蛍光強度の上昇(Fig.4)に焦点をあてた解析を行った。携帯型 Chl 蛍光測定装置(MINI-PAM, Heinz Walz GmbH)をチャンバに取り付け、飽和パルス法による測定を行ったところ、この間の熱放散は変化していないことが確認された(Fig.6)。

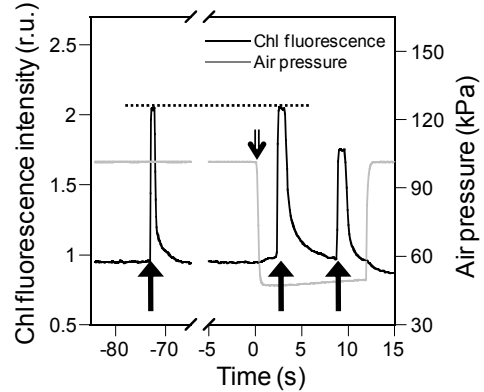


Fig.6 Changes in F_m' before and during a transient response in chlorophyll fluorescence intensity induced by a pulsed pressure reduction. The downward double line arrow indicates the starting of the pulsed pressure reduction. Upward arrows indicate application of saturation light pulse.

このことは、減圧パルスにより気孔腔内の CO_2 濃度および O_2 濃度が瞬時に半減したことで、Rubisco における CO_2 および O_2 の可用性の半減、カルビン・ベンソン回路等における NADPH 消費の遅滞、光合成電子伝達系における直線的電子伝達の停滞、光化学系 II における光合成反応に分配されるエネルギー量の低下といった反応が順次起こり、Chl 蛍光強度が上昇したことを示唆している。

(3) 減圧パルス-クロロフィル蛍光計測法による光合成速度の測定

材料および方法

供試植物として前述のトマトを用いた。長期条件下(PPFD $300 \mu mol m^{-2} s^{-1}$)において、 CO_2 濃度を変化(400, 600, $200 \mu mol mol^{-1}$ の順)させ、減圧パルス-Chl 蛍光計測を行った。なお、各 CO_2 濃度条件下において 5 分間隔で計 3 回の減圧パルスを付与した。また、光合成速度と蒸散速度についても並行して測定した。

結果および考察

Fig. 7 に光合成速度、蒸散速度および Chl 蛍光強度の変化を示す。測定の間、光合成速度と蒸散速度は安定しており、減圧パルスの連続的な付与による影響は確認されなかった。

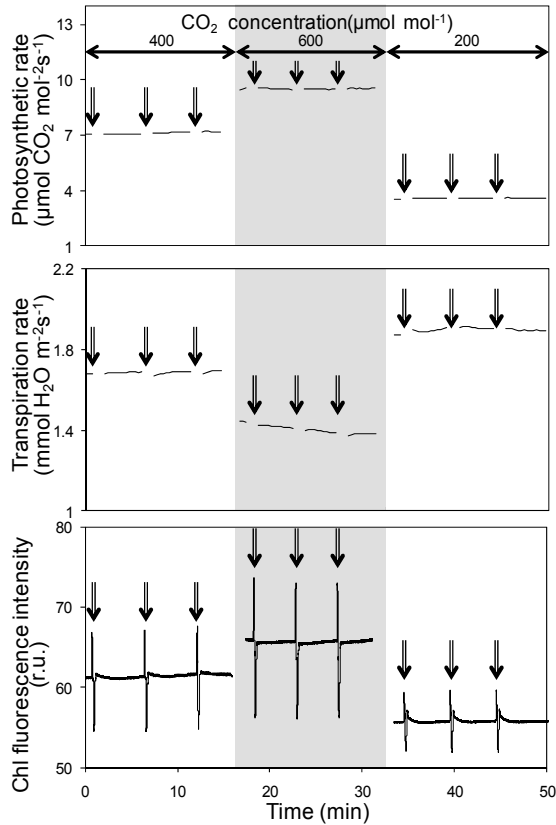


Fig.7 Time course of photosynthetic rate, transpiration rate, and chlorophyll fluorescence intensity under different CO₂ concentrations of 200, 400, and 600 μmol mol⁻¹. The downward double line arrows indicate pulsed pressure reductions.

Fig. 8 に光合成速度と減圧パルス-Chl 蛍光計測法によって取得される Peak height (defined in Fig. 4) の関係を示す。光合成速度と Peak height に高い相関があることが示された。この結果は、減圧パルス-Chl 蛍光計測法により光合成速度を簡便に測定できる可能性を示唆していた。

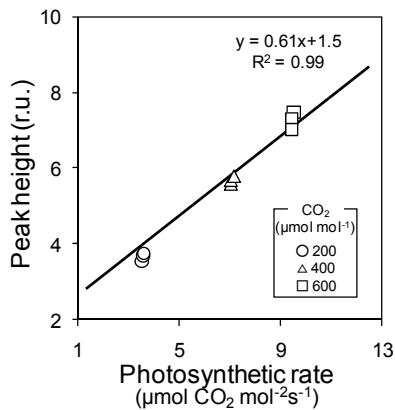


Fig.8 Relationship between photosynthetic rate and peak height measured under different CO₂ concentrations of 200, 400, and 600 μmol mol⁻¹ shown in Fig. 5

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

① 高山弘太郎, 眞鍋祐樹, 仁科弘重. 太陽光利用型植物工場におけるトマト葉を対象とした光合成速度, クロロフィル蛍光パラメータ, 気孔コンダクタンスおよび内部コンダクタンスの測定. 日本生物環境工学会 (京都), 2010 年 9 月 9 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 弘太郎 (TAKAYAMA KOUTARO)

愛媛大学・農学部・講師

研究者番号: 40380266